Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Würzburg
Komm. Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

KALLIKREIN-INHIBITOR AUS BLUTPLASMA: VERTEILUNG, ANREICHERUNG UND VERGLEICH MIT ANDEREN PROTEASEN-HEMMSTOFFEN

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hans-Georg MANKE
aus Königsberg/Opr.

Würzburg 1967

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

Komm. Vorstand: Professor Dr. D. Henschler

KALLIKREIN-INHIBITOR AUS BLUTPLASMA: VERTEILUNG, ANREICHERUNG UND VERGLEICH MIT ANDEREN PROTEASEN-HEMMSTOFFEN

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hans-Georg MANKE

aus Königsberg/Opr.

Würzburg 1967

Referent: Professor Dr. E. Habermann

Korreferent: Professor Dr. D. Henschler

Tag der Promotion: 20. 11. 67

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544724_0011

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	5
B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	8
I. Substanzen	8
1. Enzyme	8
2. Substrate	9
3. Sonstige Substanzen	9
II. Methoden und Versuche zur Methodik	9
1. Proteinbestimmung	9
2. Leitfähigkeitsmessung	9
3. Hundeblutdruck	10
4. Spaltung von Aminosäureestern	10
5. Anordnung der Inhibitorversuche	12
a. Berechnung der Inhibitoraktivität	12
b. Zur Frage der unspezifischen kompetitiven Hemmung der Proteasen durch Serumproteine	15
6. Bestimmung des Inhibitorgehaltes verschiedener Blutflüssigkeiten für Serumkallikrein und Pankreaskallikrein	16
a. am Hundeblutdruck	16
b. durch Esterolyse	17
III. Ergebnisse	20
1. Verhalten von Proteasenhemmstoffen bei Auftrennung von Humanplasma	20
a. Gelfiltration an SEPHADEX G 200	20
b. Plattenelektrophorese in Polyvinylchlorid-Pulver	22

Seite

2. Versuch zur präparativen Darstellung des Inhibitors für Serumkallikrein 25

a. Ammoniumsulfatfällung 25
b. Chromatographie an DEAE-Sephadex 27

C. DISKUSSION 29

D. ZUSAMMENFASSUNG 34

E. LITERATURVERZEICHNIS 36

A. EINLEITUNG

Der Aktivitätszustand des Kininsystems wird durch das Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Faktoren bestimmt. Begünstigend wirken: Oberflächenkontakte über eine Aktivierung des HAGEMAN-Faktors (48), ferner Aktivierung des Serumkallikreins durch proteolytische Enzyme, wie Trypsin (65) und Plasmin (34, 45, 63) (die Wirkung des letzteren ist allerdings umstritten (4, 9, 64)), schließlich "direkter" Umsatz von Kininogen mit körpereigenen und körperfremden Enzymen zu Kininen (24). Sämtliche aufgeführten Prozesse lassen sich in vitro demonstrieren; ob sie in vivo eine Rolle spielen, wird gegenwärtig von zahlreichen Arbeitskreisen untersucht. Den fördernden Faktoren des Kininsystems sind hemmende Komponenten beigegeben, die sich zwar durch geeignete Maßnahmen in vitro ausschalten lassen, in vivo jedoch für den Aktivitätszustand der kininbildenden Enzyme mitentscheidend sind. Das Kininsystem entspricht also auch in dieser Hinsicht zumindest formal dem Gerinnungssystem. Wie beim Gerinnungssystem aus dem Zusammenspiel fördernder und hemmender Faktoren im Blutplasma die "latente" Gerinnung resultiert, so kann man beim Kininsystem von einer "latenten" Kininbildung sprechen, deren Ausmaß von der Relation zwischen Aktivatoren und Inhibitoren bestimmt wird. Die Kininasen spalten die als Endprodukte der Kininbildung auftretenden Peptide; auf sie soll hier nicht näher eingegangen werden.

Bisher wurde den fördernden Faktoren des Kininsystems besondere Aufmerksamkeit zugewandt. Man kennt das Substrat der kininfreilegenden Enzyme (66), das Kininogen (5, 21, 28), und versteht die verschiedenen zu seiner Spaltung führenden Mechanismen (22, 24, 25, 29). Man hat auch eine Reihe von Kallikreinen, vor allem aus Pankreas (19, 53, 67) und aus Serum (26, 34, 67), in hochgereinigtem Zustand erhalten. Die zur Kallikrein-Aktivierung führenden Prozesse sind zwar noch weniger aufgehellt, aber in ihren Grundzügen verständlich (10, 20, 26). Wesentlich weniger weiß man

bisher über die physiologischen Gegenspieler des Systems. Wie so oft, ist auch auf diesem Gebiet die therapeutische Nutzanwendung der theoretischen Durchdringung vorausgeeilt, wie die intensive Verwendung von Proteasenhemmstoffen in der Therapie zeigt. Derartige Inhibitoren sind in großer Zahl im Organismus vorhanden. Rinderorgane (Lunge, Pankreas, Parotis) enthalten den Inhibitor von KUNITZ und NORTHROP(44), der schon vor einigen Jahrzehnten kristallisiert werden konnte und mit dem später isolierten (40, 42, 43), als Trasylol handelsüblichen Polypeptid identisch ist (2, 7, 39). Er besteht aus 58 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht um 6 500 (3, 38). Er hemmt nicht nur Kallikreine verschiedener Herkunft, sondern auch Trypsin, Chymotrypsin (17, 18), Plasmin (47) und die früheren Phasen der Blutgerinnung, hat also ein sehr breites Wirkungsspektrum. Dies mag für die Therapie von gewissem Vorteil sein, da man nicht selten mit einer gleichzeitigen Aktivierung mehrerer proteolytischer Enzyme zu rechnen hat; es erschwert aber die Abgrenzung der Bedeutung eines einzelnen Enzyms, etwa eines Kallikreins, für den Ablauf eines pathophysiologischen Prozesses. Neben dem KUNITZ-Inhibitor hat man in Organen des Hundes, des Schweines und des Rindes, sowie in solchen des Menschen, noch weitere, stärker spezifische Inhibitoren gefunden, die nur mit Trypsin (11,12) bzw. mit Trypsin und Chymotrypsin (62) reagieren. Darüberhinaus wurde kürzlich ein weiterer hormonabhängiger und nur bei männlichen Säugetieren vorkommender Inhibitor entdeckt, der ausschließlich Trypsin und Plasmin hemmt (30). Wo proteolytische Enzyme aktiviert werden können, sind meist auch entsprechende Inhibitoren vorhanden.

Die mit dem Blutplasma zirkulierenden Hemmstoffe unterscheiden sich von den organeigenen (13) durch ihr mehrfach höheres Molekulargewicht (59, 68). Es gelang, Trypsin-Inhibitoren aus Rinderplasma (8, 55, 68) bzw. -serum (16, 57), Humanserum (6, 31, 32, 33, 36, 52, 59, 60) und -plasma (61), sowie aus Schafserum (49, 50), zu isolieren. Der Hemmstoff aus Rinderplasma konnte sogar in kristallisiertem Zustand erhalten werden (68). Gemeinsam ist diesen Substanzen ihre elektrophoretische Wanderung im Bereich der α -Globuline, was wiederum damit zusammenhängt, daß sie

in die Kategorie der sauren Glykoproteide fallen. Unterschiede bestehen hinsichtlich der relativen Aktivität gegenüber verschiedener proteolytischen Enzymen, wie Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin. Es scheinen auch in gleichem Plasma mehrere Inhibitoren nebeneinander vorzuliegen, die sich in ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und in ihrem Wirksamkeitsspektrum unterscheiden, schließlich auch anhand ihrer relativen Säurelabilität differenziert werden können (54). Dazu kommt noch die Existenz eines weiteren, von den bisher genannten Inhibitoren verschiedenen Serumfaktors, der proteolytische Enzyme, z. B. Trypsin, unter Schonung und Stabilisierung eines Teiles ihrer Eigenschaften, z. B. der Fähigkeit zur Esterolyse, zu binden vermag (14, 15, 31, 37, 51).

Nachdem Kallikreine, wie die ihnen eng verwandten esterolytischen Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin, gegen organeigene Inhibitoren empfindlich sind, liegt die Annahme nahe, daß die bisher bekannten serumeigenen Hemmstoffe ein breiteres, Kallikreine einbeziehendes Spektrum aufweisen. Eine Zuordnung z. B. von Antikallikrein- und Antitrypsinwirkung ist bisher noch nicht versucht worden, obwohl das Hemmvermögen von Gesamtplasma gegen Kallikreine und auch die Eigenschaften von gereinigten plasmaeigenen Proteasen-Inhibitoren seit Jahrzehnten Gegenstand von Untersuchungen gewesen sind. Dabei verspricht die Kenntnis der Wechselwirkung zwischen gereinigten Inhibitoren und Kallikreinen Aufschlüsse über die physiologische Bindung des Serumkallikreins und über die zu seiner Aktivierung führenden Prozesse.

Es soll daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht werden, das Hemmvermögen von Blutplasma gegenüber Serumkallikrein durch Gelfiltration und Elektrophorese bestimmten Proteinfraktionen zuzuordnen. Anschließend sollte der Inhibitor gereinigt, konzentriert und von anderen Faktoren des Kininsystems abgetrennt werden.

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. SUBSTANZEN

1. Enzyme

Serumkallikrein: aus caseinaktiviertem Schweineserum (FREY, KRAUT und WERLE) durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose von HABERMANN und KLETT (26) dargestellt. Bei Reihenversuchen verwendeten wir partiell gereinigtes Serumkallikrein (Charge S 28 B I, 40 Einheiten Serumkallikrein/mg Protein entsprechend). Zum Vergleich der esterolytischen Aktivität von Serumkallikrein, Pankreaskallikrein und Trypsin stand Serumkallikrein einer besser gereinigten Charge (S 23, 125 Einheiten Serumkallikrein/mg Protein entsprechend) zur Verfügung .

Pankreaskallikrein (1000 FREY - Einheiten/mg): aus Padutin-Rohpulver (Bayer, Leverkusen) durch Gelfiltration an SEPHADEX G 75, Elektrophorese und anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnen (HABERMANN und TRUSCHEIT, unveröffentlicht). Bei der Ermittlung des Pankreaskallikrein-Inhibitorgehaltes von Humanplasma und Schweineserum benutzten wir eine noch nicht völlig gereinigte Pankreaskallikrein-Lösung (1000 FREY-Einheiten/ml), die mit physiologischer Kochsalzlösung 1:1000 verdünnt wurde.

Trypsin: handelsübliches, kristallisiertes Trypsin (C. F. Boehringer, Mannheim).

Chymotrypsin verdanken wir Herrn Dr. Gundlach, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg.

2. Substrate

N- α -Tosyl-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (TAME), (SERVA, Heidelberg) wurde als Substrat für die Esterolyse durch Trypsin, Serumkallikrein, Pankreaskallikrein und Plasma verwendet.

N-Acetyl-L-Tyrosin-Äthylester (ATEE), (MANN Research Laboratories) diente als Substrat für Chymotrypsin.

3. Sonstige Substanzen

Human-Albumin "reinst" sowie Rinderserum-Albumin "reinst" wurden von den Behringwerken A.G., Marburg/Lahn, bezogen.

II. METHODEN UND VERSUCHE ZUR METHODIK

1. Proteinbestimmung

a) bei eiweißarmen Lösungen mit FOLIN'schem Reagenz nach LOWRY, ROSEBROUGH, FARR und RANDALL (46) unter Verwendung eines UNICAM-Photometers;

b) bei eiweißreichen Lösungen durch Extinktionsmessung der 1/10 und 1/100 mit 1 n Natronlauge verdünnten Proteinlösungen im BECKMAN Spektrophotometer Modell DU bei 280 mμ.

Die Eichkurve wurde in beiden Fällen mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin "reinst" aufgestellt.

2. Leitfähigkeitsmessung

Die Ionenkonzentration bei der Gradientenelution wurde nach 100 facher Verdünnung der Eluate durch Leitfähigkeitsmessungen mit einem Gerät der Firma Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten, Weilheim/Obb., Type LBR, bestimmt.

3. Hundeblutdruck

Der Carotisdruck eines mit Pernokton narkotisierten Hundes wurde mit einem Quecksilbermanometer gemessen und auf ein Ruß-Kymographion registriert. Das Tier wurde zunächst durch i.v. Injektionen wechselnder Mengen von Serum- bzw. Pankreaskallikrein geeicht. Dann inkubierten wir Serumkallikrein bzw. Pankreaskallikrein 10 min bei Raumtemperatur zu gleichen Teilen mit Verdünnungen von Plasma bzw. Plasmafraktionen.

Aus der Minderung des Ausschlages wurde die Menge des gehemmten Serumkallikreins (bzw. Pankreaskallikreins) errechnet.

4. Spaltung von Aminosäureestern

Serumkallikrein, Pankreaskallikrein, Trypsin und Chymotrypsin spalten N-substituierte Aminosäureester. Sie bzw. ihre Hemmstoffe lassen sich anhand dieser Reaktion erfassen. Für Chymotrypsin kann N-Acetyl-L-Tyrosin-Äthylester (ATEE) als Substrat dienen, für die übrigen genannten Enzyme ein N-substituierter Argininester, z.B. N- α -Tosyl-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (TAME).

Wir verwendeten die Methode von HESTRIN (35) mit den von ROBERTS (56) eingeführten Verbesserungen. Die dabei erforderliche Behandlung der Ansätze mit Trichloressigsäure führte nicht zu einer zusätzlichen Esterolyse, wie eigene Vorversuche zeigten: löst man TAME in 0,1 m Trispuffer pH 7,8 und versetzt dann - entsprechend den Proportionen unserer Ansätze - mit 16 % Trichloressigsäure, so wird es noch nach 1 Stunde photometrisch quantitativ wiedergefunden.

Ansätze:

0,1 ml Enzymverdünnung in 0,85 % NaCl + 0,1 ml Inhibitor in 0,85 % NaCl + 0,4 ml = 10 μ Mol der synthetischen Aminosäureester TAME (9,45 mg/ml) oder ATEE (6,25 mg/ml), gelöst in 0,1 m Trispuffer pH 7,8. Das Gemisch blieb in einem spitzen Zentrifugenglas eine Stunde bei 37° C im Wasserbad; dann wurde die Esterolyse durch Zugabe von 0,2 ml 16 % Trichloressigsäure

gestoppt. Bei diesem Schritt fielen auch die im Ansatz enthaltenen Proteine aus, die das Ablesen der Extinktion stören konnten. Nach Zentrifugieren (10 min bei 2000 U/min) entnahmen wir 0,4 ml des Überstandes und gaben zum partiellen Neutralisieren 0,1 ml 1 n NaOH zu.

Nach Alkalisieren mit 0,3 ml 3,5 n NaOH setzten wir den noch vorhandenen Ester mit 0,3 ml frisch zubereiteter 2 molarer wässriger Hydroxylammoniumchlorid-Lösung um. Nach 25 min Stehen bei Raumtemperatur wurden dem mit 0,3 ml HCl (konzentrierte Salzsäure-Wasser 1 : 2) angesäuerten Ansatz 5 ml 0,11 m $FeCl_3$ (in 0,04 m HCl gelöst) zugefügt. Den freiwerdenden Stickstoff entfernten wir durch kurzes Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe; dann bestimmten wir die Extinktion im UNICAM-Photometer bei 525 mμ und einer Schichtdicke von 1 cm.

Der so erhaltene Wert wurde von dem einer Kontrolle (mit TAME, aber ohne Enzym) subtrahiert. Zieht man von dem Kontrollwert einen esterfreien Blindwert ab, so kann dessen korrigierte Extinktion mit 100 % oder 10 μMol TAME bzw. ATEE gleichgesetzt werden.

Ein Vergleich der TAME-Spaltung durch Serumkallikrein (S 23, 125 E. Serumkallikrein/mg) mit der durch Pankreaskallikrein (1000 FREY-Einheiten/mg) und Trypsin ergab einen Aktivitätsabfall in der Reihenfolge Trypsin $\gg$ Serumkallikrein $>$ Pankreaskallikrein. Die Blutdruckwirksamkeit stieg in entgegengesetzter Richtung an (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Blutdruckwirksamkeit und Esterolyse durch verschiedene Proteasen

	μMol TAME/mg Enzym gespalten	Blutdrucksenkung in Serumkallikrein-E/mg Protein
Trypsin	9750	1 - 1,2
Serumkallikrein	1150	125
Pankreaskallikrein	772	3000 - 5000 +

+ Pankreaskallikrein bildet Kinin-10 und ruft eine relativ langsame Drucksenkung hervor; Serumkallikrein senkt den Blutdruck kurzzeitig und legt Kinin-9 frei. Die relative Kreislaufaktivität der beiden Enzyme ist auch von Versuchstier und Versuchsdauer abhängig.

5. Anordnung der Inhibitorversuche

Die Hemmwirkung von Plasma bzw. seinen Fraktionen auf die Esterolyse erfaßten wir in Abwandlung der unter 4. beschriebenen Versuchsanordnung: 0,1 ml Enzymlösung inkubierten wir mit 0,1 ml Inhibitorlösung 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur und gaben dann den Aminosäureester dazu.

Es durfte gerade soviel Enzym eingesetzt werden wie notwendig war, um die vorgegebene Substratmenge von 10 µMol nahezu, aber nicht vollständig, zu spalten. Nur dann war zu erwarten, daß auch kleine Inhibitormengen erfaßt werden konnten. Zunächst mußten also geeignete, unvollständig spaltende Enzymkonzentrationen gesucht werden. Wir bildeten Verdünnungsreihen von Serumkallikrein (1 : 2500 bis 1: 160 000), Pankreaskallikrein (1 : 25 000 bis 1 : 400 000), sowie von Chymotrypsin (1 : 1000 bis 1 : 1 024 000) und Trypsin (1 : 25 000 bis 1 : 400 000) und wählten schließlich folgende Enzymkonzentrationen für die Inhibitorversuche aus (s. Abb. 1 und 2):

Serumkallikrein	1 : 5000
Chymotrypsin	1 : 100 000
Trypsin	1 : 100 000

Pankreaskallikrein wurde einstweilen nicht eingesetzt.

a. Berechnung der Inhibitoraktivität

Da nach Abbildung 1 eine lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Esterolyse besteht, gleichgültig, ob man Hemmstoffe zusetzt oder nicht, war es erlaubt, aus der Extinktionsdifferenz zwischen inhibitorfreien und inhibitorhaltigen Ansätzen den Hemmstoffgehalt zu berechnen. Dazu waren wir um so mehr berechtigt, als die Esterspaltung durch eine Standarddosis Serumkallikrein linear mit der zugesetzten Inhibitormenge abnimmt.

Es wurden also Verdünnungen des zu prüfenden Materials hergestellt und mit einer Standardmenge Serumkallikrein gemischt, dann mit TAME inku-

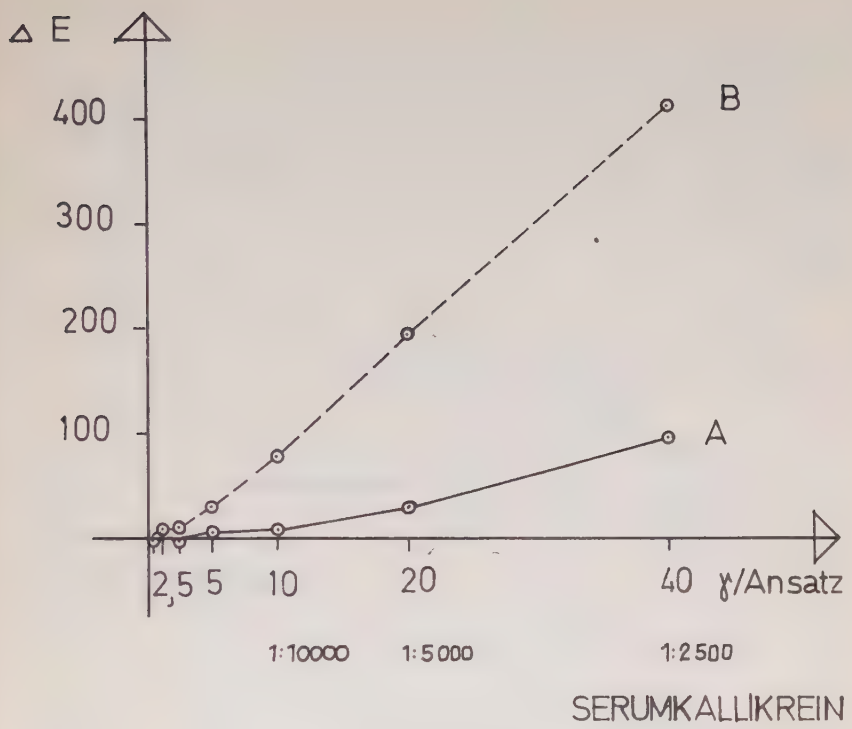


Abbildung 1: Hemmung von Serumkallikrein verschiedener Konzentration durch (A) unverdünntes und (B) 1/10 verdünntes EDTA-Plasma.

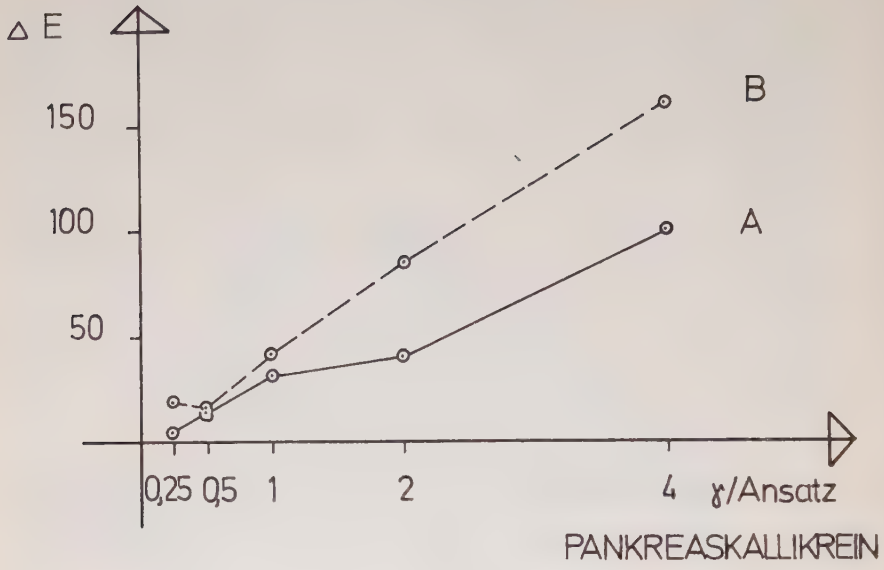


Abbildung 2: Hemmung von Pankreaskallikrein verschiedener Konzentration durch (A) unverdünntes und (B) verdünntes EDTA-Plasma.

biert. Ansätze, in denen nur eine sehr geringe Hemmung ($\triangle$ E < 0,05) bzw. eine fast totale Hemmung aufgetreten war, wurden nicht berücksichtigt. Bei den im verwertbaren Bereich liegenden Versuchen wurde das Tausendfache der Extinktionsdifferenz mit dem Verdünnungsfaktor der eingesetzten Inhibitorlösung und - da nur 0,1 ml pro Ansatz zugegeben wurden - mit 10 multipliziert. Das Resultat gibt die Einheiten pro ml Inhibitorlösung wieder.

Beispiel:

Extinktion der enzymfreien, substrathaltigen Kontrolle : 0,450
Extinktion der enzymfreien, substratfreien Kontrolle : 0,020
Extinktion der enzym- und substrathaltigen Kontrolle : 0,080
Extinktion eines Versuchs, der 0,1 ml einer 1/10 verdünnten Inhibitorlösung enthält : 0,230

$$(\underbrace{0{,}230 - 0{,}080}_{\triangle E}) \times 1\,000 = 150 \times 10 \times 10 = 15\,000 \text{ E/ml}$$

b. Zur Frage der unspezifischen Hemmung der Esterolyse durch Serumproteine

Es war nun zu prüfen, ob die Inhibitorwirkung von Humanplasma gegenüber Serumkallikrein zum Teil oder ganz unspezifisch war, z. B. durch Albuminzusatz reproduziert werden konnte.

Je 0,1 ml der jeweiligen Enzymlösung wurden mit 0,1 ml einer Humanalbumin-Verdünnung versetzt (1 : 50, 1 : 200, 1 : 800 und 1 : 3200 in 0,05 m Phosphatpuffer pH 7, 8, 0,2 m NaCl enthaltend). Kontrollen enthielten den genannten Puffer ohne Albumin bzw. Albumin ohne Enzym.

Ergebnis:

Albumin hemmt weder die TAME-Spaltung durch Trypsin (1 : 100 000) und Serumkallikrein (1 : 5000), noch die ATEE-Spaltung durch Chymotrypsin (1 : 100 000). Unser Albuminpräparat war frei von esterolytischen Verunreinigungen.

6. Bestimmung des Inhibitorgehaltes verschiedener Blutflüssigkeiten für Serumkallikrein und Pankreaskallikrein

Um den Serumkallikrein-Inhibitor gewinnen zu können, benötigten wir ein Ausgangsmaterial mit möglichst hohem Hemmvermögen. Wir untersuchten deshalb Citratplasma vom Menschen und Serum von Rind und Schwein.

a. Hundeblutdruck

1 ml Serumkallikrein (1 : 10 000 in 0,85 % NaCl) inkubierten wir bei Raumtemperatur 15 min lang mit 1 ml unverdünntem bzw. 1/10 mit 0,05 m Phosphatpuffer pH 6,9 verdünntem Humanplasma bzw. Rinderserum. Ein Ansatz mit Phosphatpuffer diente als Kontrolle. Aus der am Rußkymographion registrierten Blutdrucksenkung ermittelten wir die Aktivitätsminderung anhand einer Eichkurve mit reinem Serumkallikrein.

In analoger Weise versuchten wir auch den Inhibitorgehalt für Pankreaskallikrein im Blut festzustellen. Bezüglich der Enzympräparate sei auf die Methodik verwiesen. Weitere Versuchsreihen enthielten Kochsalzlösung anstelle von Kallikreinen; kein derartiger Ansatz senkte den Blutdruck.

Ergebnisse: (s. Tabelle 2 und Abbildung 3)

Humanplasma und Rinderserum inaktivierten Serumkallikrein etwa gleich stark. Die Hemmwirkung gegenüber Pankreaskallikrein war geringer; Rinderserum war hier etwas wirksamer als Humanplasma.

Tabelle 2: Relative Blutdruckaktivität von Kallikreinen nach Inkubation mit Plasmaverdünnungen

Zusatz	Serumkallikrein	Pankreaskallikrein
Humanplasma unverdünnt	0,2	0,8
1/10 verd.	0,6	1,0
Rinderserum unverdünnt	0,2	0,4
1/10 verd.	0,6	0,6
Phosphatpuffer	1,0	1,0

b. durch Esterolye

Ansätze: 0,1 ml unverdünntes, 1/4 bzw. 1/16 mit 0,85 % NaCl verdünntes Plasma bzw. Serum + 0,1 ml Serumkallikrein 1 : 5 000 bzw. 0,85 % NaCl. Kontrolle und Weiterbehandlung wie unter 4. ; zusätzlich waren kallikreinfreie Kontrollen erforderlich, weil Plasma und Serum Ester spalten und dadurch die Auswertung des Inhibitorgehaltes beeinflussen. Diese "Eigenesterolyse" ist also zur Ermittlung der durch das zugesetzte Serumkallikrein bedingten Esterolyse zu subtrahieren.

Ergebnis: (s. Abbildung 4).

Der Inhibitorgehalt von Rinderserum und Schweineserum ist etwa gleich hoch. Humanplasma hemmt etwas schwächer.

Die kallikreinfreien Plasmaverdünnungen verdoppelten den Arbeitsaufwand; daher versuchten wir die serumeigenen Esterasen selektiv thermisch zu zerstören. Unabhängig von der Dauer des Erhitzens (30 Minuten bzw. 3 Stunden auf jeweils 50° bzw. 60° C) tritt eine Zerstörung der plasmaeigenen Esterasen erst bei 60° C ein; bei dieser Temperatur ist jedoch auch ein deutliches Absinken der Inhibitoraktivität zu verzeichnen. Bei dreistündigem Erhitzen auf 50° C ist weder eine Minderung der Esterasenaktivität

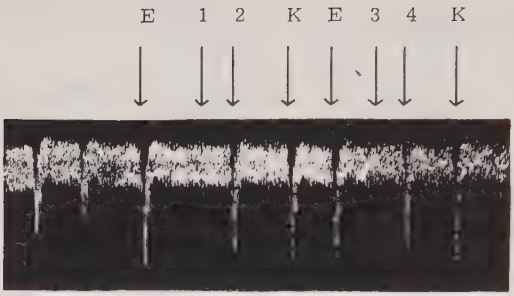


Abbildung 3: Rinderserum und Humanplasma hemmen im Hundeblutdruckversuch Serumkallikrein etwa gleich stark.
(E) Eichung des Tieres mit 50 γ Serumkallikrein.
Hemmung der gleichen Menge Serumkallikrein durch Rinderserum (1) unverdünnt und (2) zu 1/10 mit Phosphatpuffer verdünnt -bzw. durch Humansplasma (3) unverdünnt und (4) 1/10 verdünnt.
(K) Kontrolle: an Stelle von Serum Phosphatpuffer.

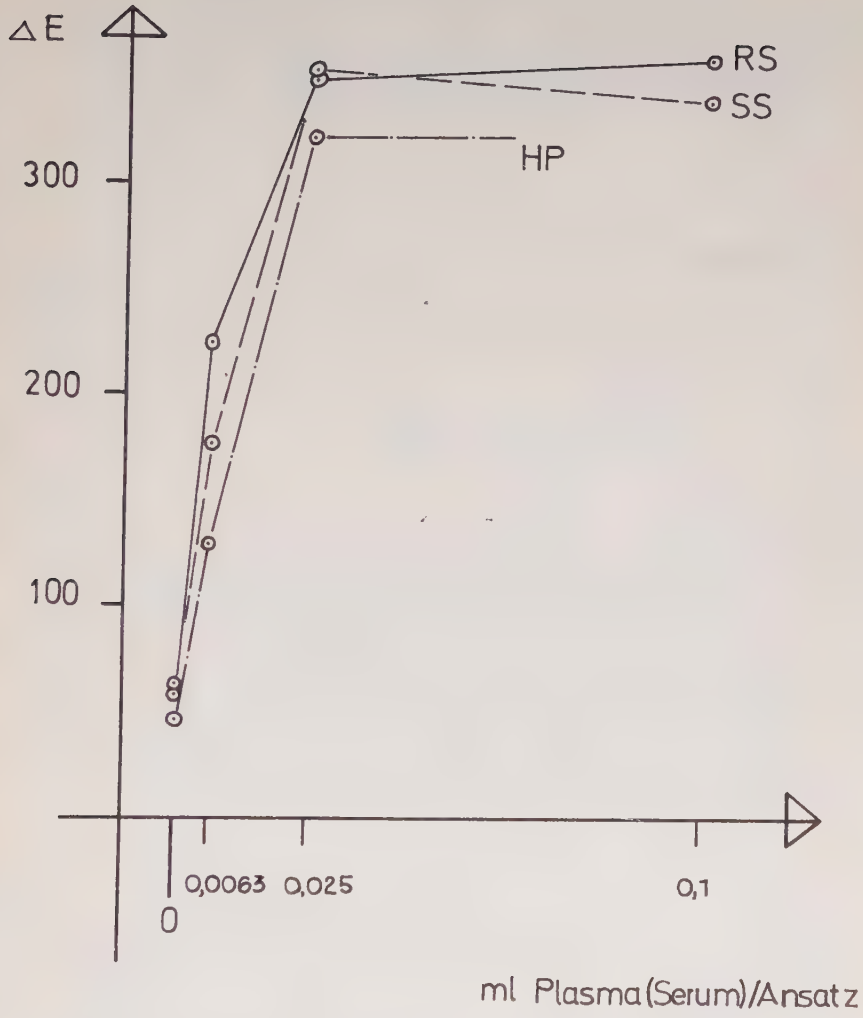


Abbildung 4: Das Hemmvermögen von Humanplasma (H-P), Rinderserum (RS) und Schweineserum (SS) gegenüber Serumkallikrein.

noch eine solche der Inhibitoren nachweisbar. Man kann also auf diesem Wege die plasmaeigenen Esterasen nicht selektiv zerstören. Der Versuch zeigt umgekehrt, daß die Kallikrein-Inhibitoren mindestens zum Teil thermolabil sind.

III. ERGEBNISSE

1. Verhalten von Proteasenhemmstoffen bei Auftrennung von Humanplasma

a. Gelfiltration an SEPHADEX G 200

Versuchsanordnung:

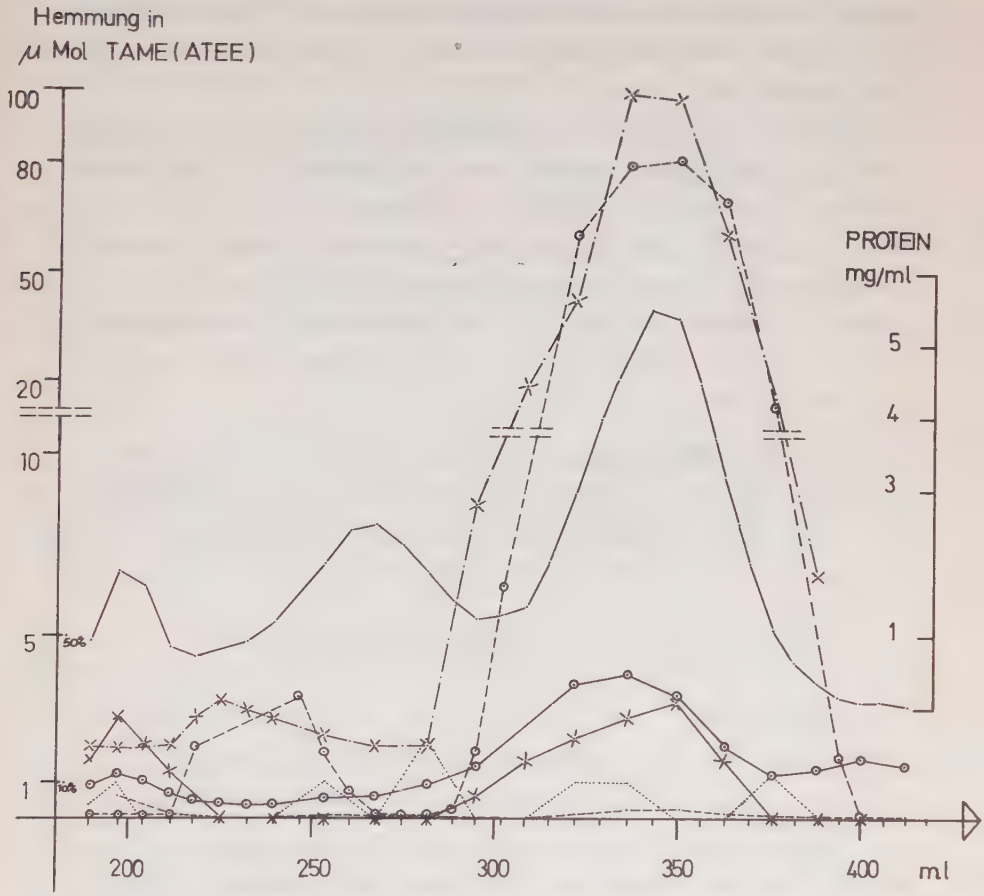
SEPHADEX G 200 wurde nach mehrfachem Sedimentieren in 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,8 (0,2 m NaCl enthaltend) in ein Glasrohr (Durchmesser 3 cm, Länge 80 cm, Volumen 565 ml) gefüllt und mit dem genannten Puffer durchströmt. 6 ml Citratplasma vom Menschen (5 Tage bei + 2° C aufbewahrt) wurden im Kälteraum durch Unterschichten auf die Oberfläche der Säule gebracht. Nach einem Vorlauf von 183 ml wurden binnen 15 Stunden 235,5 ml Eluat in Fraktionen zu etwa 7 ml gesammelt.

Ergebnisse: (s. Abbildung 5).

Der Proteingehalt von jeweils 0,025 ml Eluat wurde mit der modifizierten FOLIN'schen Reaktion ermittelt. Es wurden, wie auch von anderen Autoren, drei Proteingipfel festgelegt.

Die TAME-Spaltung durch die Plasmafraktionen (Ansatz: 0,2 ml Eluat + 0,4 ml TAME-Lösung, weiterverarbeitet entsprechend Seite 10) war unbedeutend; ein definiertes Maximum ließ sich nicht festlegen.

Abbildung 5: Fraktionierung von Humanplasma an SEPHADEX G 200 (r = 1,5 cm, Länge 80 cm), im Gleichgewicht mit 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,8.
Proteingehalt in mg/ml (·————·), plasmaeigene Esterasen in μ Mol (·– – – –·), Trypsinhemmung in μ Mol (⊙– – – –⊙), Chymotrypsinhemmung in μ Mol (╳—·—╳), Serumkallikreinhemmung in μ Mol (⊙————⊙) und im Versuch am Hundeblutdruck in % der pro Ansatz verwendeten Serumkallikreinmenge (╳————╳), Pankreaskallikreinhemmung in % der pro Ansatz verwendeten Pankreaskallikreinmenge (Versuch am Hundeblutdruck) (·····).



Die Trypsinhemmung (Ansatz: 0,1 ml Eluat unverdünnt bzw. - in hohen Extinktionsbereichen - 1/10 verdünnt + 0,1 ml Trypsin 1: 100 000 in 0,85 % NaCl) verteilte sich auf zwei Maxima; ein relativ niedriges lag im Globulinbereich, das weitaus größte in der Region der Albumine.

Die ebenfalls zweigipfelige Chymotrypsinhemmung (Ansatz: 0,1 ml Eluat unverdünnt bzw. 1/10 verdünnt + 0,1 ml Chymotrypsin 1 : 100 000 in 0,85 % NaCl) entsprach in Verteilung und Ausmaß nahezu der Trypsininhibition. Das Maximum der Chymotrypsinhemmung im Bereich der Makroglobuline war etwas nach links verschoben, d.h. in Richtung auf höhere Molekulargewichte.
Auch die Hemmung der durch Serumkallikrein bedingten TAME-Spaltung (Ansatz: 0,1 ml Eluat unverdünnt bzw. 1/10 verdünnt + 0,1 ml Serumkallikrein 1 : 5 000 in 0,85 % NaCl; weiterbehandelt wie auf S. 10) erschien in je einem Gipfel im Bereich der Albumine und Makroglobuline. Sie war allgemein wesentlich schwächer ausgeprägt. Der höhere Gipfel fiel wieder in die Region der Albumine. Das Maximum im Globulinbereich lag bei noch größeren Molekulargewichten als die Inhibitormaxima für Trypsin und Chymotrypsin.

Bei Prüfung am Hundeblutdruck erschienen die Hemmstoffe für Serumkallikrein in den bereits anhand der Esterolyse definierten Plasmafraktionen (s. Abb. 5). Jedoch war die Wirksamkeit des makroglobulären Gipfels mehr als doppelt so hoch als aufgrund der TAME-Spaltung zu erwarten war.

b. Plattenelektrophorese in Polyvinylchlorid-Pulver

Versuchsanordnung:

GEON X-427 (SERVA, Heidelberg) wurde mehrmals in Wasser, danach in 0,06 m Veronal-Veronal-Na-Puffer pH 8,6 sedimentiert, dann als Brei auf einer gerahmten Glasplatte ausgegossen, die durch ein darunterliegendes, mit wäßrigem Methylalkohol durchströmtes Kammersystem auf etwa + 2° C gekühlt wurde.

An die Schmalseiten der 0,5 x 44,3 x 18,5 cm großen Schicht wurden ebenso breite, mehrfach gefaltete WHATMAN I - Filterpapierstreifen gelegt, die vorher mit Puffer getränkt und in Cellophanmembranen eingeschlagen worden waren. Diese verbanden die GEON-Platte mit Glasschalen, die mit Puffer gefüllt waren und die Platinelektroden aufnahmen.

Etwa 5 cm vom kathodischen Plattenende entfernt wurde ein 2 cm breiter Graben ausgestochen. Eine entsprechende Menge des mit Wasser gewaschenen und im Exsiccator getrockneten Trägermaterials wurde mit 11 ml Citratplasma verrührt und eingefüllt. Über der Schicht wurde mit Hilfe von Distanzstreifen und einer Glasplatte eine feuchte Kammer hergestellt.

An die beiden Elektroden wurde eine Spannung von 470 V (32 mA) gelegt. Die Anode befand sich am grabenfernen Ende der Platte. Nach 24 Stunden war die vorderste Zone der Plasmafraktionen 30 cm weit gewandert. Die Platte wurde der Länge nach halbiert, die eine Hälfte in 1 cm breiten Streifen abgetragen, in 3 ml 0,85 % NaCl aufgeschwemmt und dann filtriert. Die Eluate wurden bei 0° C aufbewahrt.

Ergebnisse: (s. Abbildung 6).

Die Plasmaproteine erschienen in vier Gipfen, wie die Eiweißbestimmung mit FOLIN'schem Reagenz unter Verwendung von jeweils 0,05 ml Eluat zeigte. Ihre Zusammensetzung wurde mit Hilfe der Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien festgestellt (vgl. Abb. 6).

Eine TAME-Spaltung durch die Plasmafraktionen (Ansatz mit 0,2 ml Eluat, Versuchsanordnung s. Seite 10), war nur im γ-Globulin-Bereich eben noch erkennbar.

Die Hemmung von Trypsin prägte sich zweigipfelig - im Bereich der α_1-Globuline und (schwächer) der β_1-Globuline - aus.

Die Serumkallikreinhemmung erschien dagegen in einem einzigen Gipfel im α_2-Bereich, zwischen den beiden Maxima der Antitrypsine. Für den Antagonismus gegen Trypsin bzw. Serumkallikrein sind also verschieden-

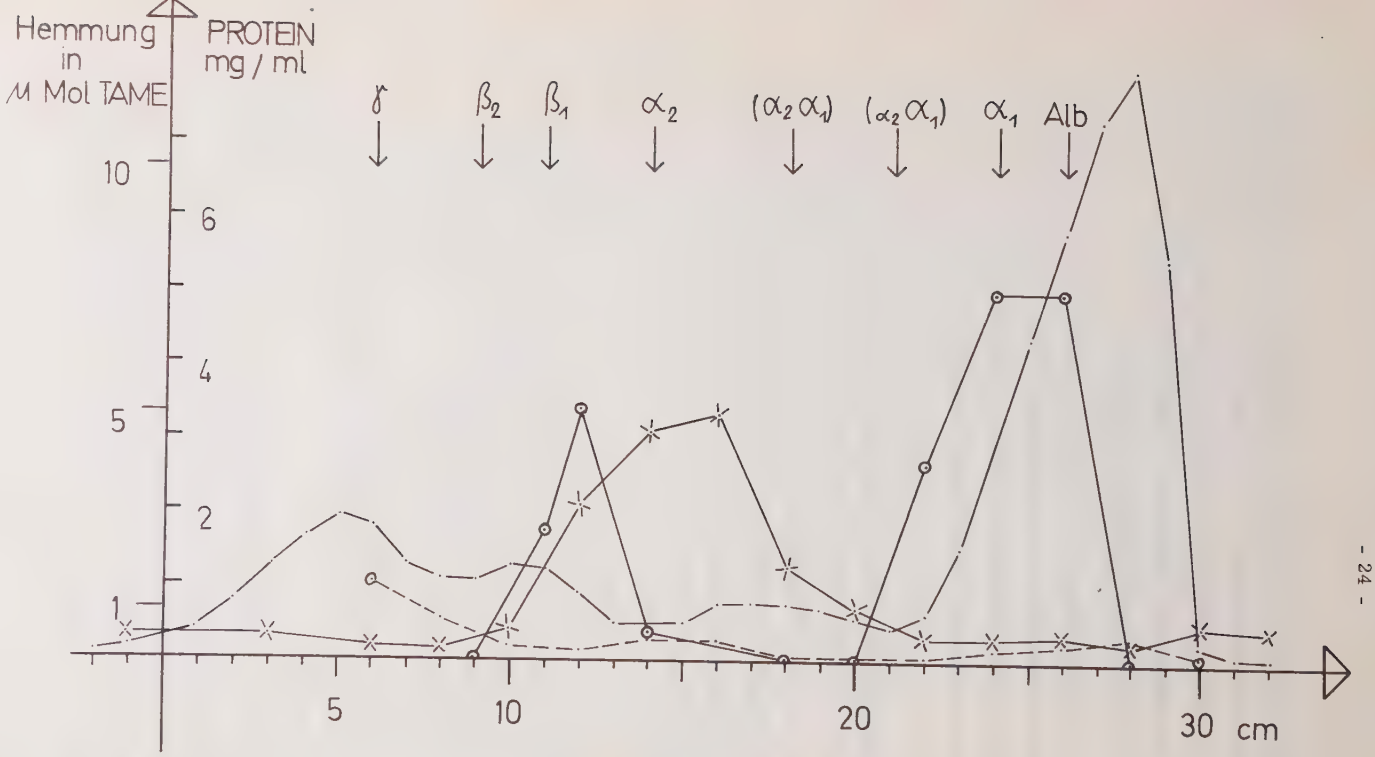


Abbildung 6: Fraktionierung von Citratplasma durch Elektrophorese an GEON X-427, im Gleichgewicht mit 0,06 m Veronal-Veronal. Na-Puffer pH 8,6; bei 32 mA und 470 V.

Proteingehalt in mg/ml (·——·——·); plasmaeigene Esterasen in µ Mol (⊙——⊙), Trypsinhemmung in µ Mol (⊙——⊙), Serumkallikreinhemmung in µMol (✕——✕). Klassifizierung der Eiweißgipfel mit Hilfe der Membranfolienelektrophorese: Albumine (Alb), Globuline (α_1, α_2, β_1, β_2, γ).

artige Inhibitpren verantwortlich.

2. Versuche zur präparativen Darstellung des Serumkallikrein-Inhibitors

a. Ammoniumsulfatfällung

100 ml Rinderserum wurden mit Wasser auf 400 ml verdünnt; nach Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis 55 % Sättigung ließen wir ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen und zentrifugierten dann ab. Das Präcipitat (a) lösten wir in Wasser und brachten es auf ein Volumen von 100 ml. Zum Überstand gaben wir Ammoniumsulfat bis zu 70 % Sättigung, ließen eine Nacht bei Raumtemperatur stehen und erhielten ein Präcipitat (b), das wir wiederum mit Wasser zu 100 ml lösten, sowie 420 ml Überstand (c). (b) enthielt die weitaus größte Menge an Inhibitor, war jedoch deutlich verunreinigt, unter anderem durch plasmaeigene Esterasen.

Zur weiteren Reinigung brachten wir deshalb (b) mit H_2O auf 400 ml, kühlten davon 200 ml auf 0° C und stellten mit Essigsäure auf pH 4,5 ein, den isoelektrischen Punkt von Albumin. Wir erhielten bei 50 % Ammoniumsulfat-Sättigung das Präcipitat (d), bei 55 % Sättigung Präcipitat (e), bei 70 % Sättigung (f) und Überstand (g). Die Präcipitate wurden jeweils nach 15 Minuten abzentrifugiert, in H_2O gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Wir wollten mit der Kühlung des Gemisches auf 0° C vermeiden, daß der Inhibitor bei dem verhältnismäßig tiefen pH von 4,5 an Aktivität verlöre, wie es beispielsweise vom Trypsininhibitor her bekannt ist (59). In einem zweiten Versuch zur präparativen Gewinnung des Serumkallikrein-Inhibitors entschlossen wir uns aber dazu, bei Zimmertemperatur, jedoch möglichst schnell zu fällen.

Der Serumkallikrein-Inhibitor fand sich bei beiden Versuchen in der zwischen 55 und 70 % Ammoniumsulfat-Sättigung präcipitierenden Fraktion.

Im Rinderserum waren bei diesem Versuch nur sehr niedrige Inhibitoraktivitäten nachweisbar (s. Tabelle 3), die in keinem Verhältnis zu den Aktivitäten der aus diesem Serum gewonnenen Fraktionen (a), (b) und (c) standen. Spätere von HABERMANN durchgeführte Versuche ergaben für 100 ml Rinderserum eine Gesamtaktivität von 2930 bzw. 3540 Einheiten. Bezogen auf diese Werte von HABERMANN gelang uns bei diesem Reinigungsschritt eine 17 bis 20 fache Reinigung des Inhibitors.

Tabelle 3: Konzentration und Gesamtmenge des Serumkallikrein-Inhibitors in Rinderserum und in den durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Fraktionen

	Volumen ml	Gesamteiweiß mg	Inhibitoraktivität E/ml	E gesamt	E/mg-Protein
Rinderserum	100	13 200	(9,9)	(990)	(0,075)
pH 7					
(a) 50 % AS+	100	8 820	0,9	90	ca. 0,01
(b) 70 % AS	400	3 100	6,0	2 400	0,77
(c) > 70 % AS	432	350	0,6	260	0,74
				2 750	
pH 4,5					
(d) 50 % AS	200	2 240	1,5	300	0,13
(e) 55 % AS	200	520	1,8	360	0,69
(f) 70 % AS	200	520	11,6	2 320	4,46
(g) > 70 % AS	492	84	-	-	-
				2 980	

+ (AS = Ammoniumsulfatsättigung, bei der die Fraktion jeweils ausfiel.)

200 ml Fraktion (f) wurden eine Nacht bei 2° C gegen 0,005 m Phosphatpuffer pH 6,3 dialysiert; das Volumen nach der Dialyse betrug 210 ml.

b. Chromatographie an DEAE-SEPHADEX

Zur weiteren Reinigung adsorbierten wir 70 ml der dialysierten Fraktion (f)an eine DEAE-SEPHADEX-Säule (Länge 18 cm, Durchmesser 2 cm, Volumen 56,5 ml), die vorher mit 0,005 m Phosphatpuffer pH 6,3 (0,02 m NaCl enthaltend) durchströmt worden war. Dann steigerten wir binnen 12 Stunden mit Hilfe eines 500 ml-Mischkölbchens, gefüllt mit 0,005 m Phosphatpuffer pH 6,3 mit 0,02 m NaCl, die Ionenstärke kontinuierlich auf 0,5 m Phosphatpuffer pH 6,3 mit 0,5 m NaCl. Die Eluate wurden in 42 Portionen zu etwa 7 ml aufgefangen.

Ergebnisse: (s. Abbildung 7).

Die Proteinbestimmung mit FOLIN'schem Reagenz lieferte eine zweigipflige Kurve.

Die Serumkallikreinhemmung, gemessen an der TAME-Spaltung (Ansatz: 0,05 ml Eluat + 0,05 ml 0,85 % NaCl + 0,1 ml Enzym), erschien als deutlicher Gipfel mit dem Maximum in Fraktion 30, in einem relativ proteinarmen Bereich. Es wurde also ein hoher Reinigungsgrad erzielt. Das feste Haftvermögen des Inhibitors an dem basischen Adsorbens läßt vermuten, daß er ein stark saures Protein, wahrscheinlich ein Glykoprotein ist; zuckerfreie Plasmaproteine entsprechender Acidität sind nicht bekannt.

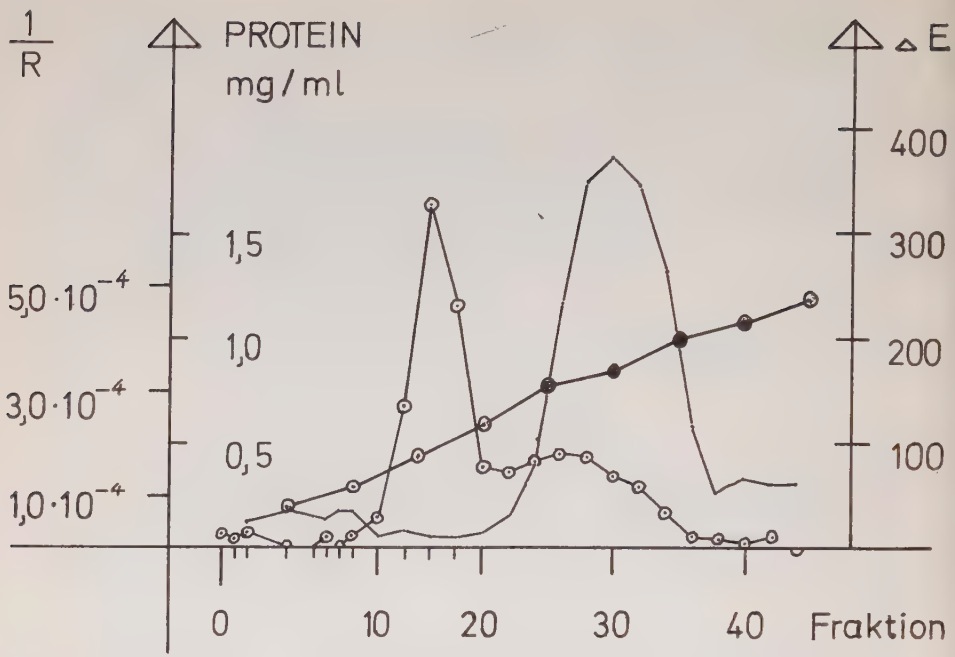


Abbildung 7: Präparative Reinigung des Serumkallikrein-Inhibitors an DEAE-SEPHADEX (r = 1 cm, Länge = 18 cm), im Gleichgewicht mit 0,005 m Phosphatpuffer pH 6,3 (0,02 m NaCl enthaltend).

Gradient: über einen 500 ml-Mischkolben von 0,005 m Phosphatpuffer pH 6,3 (0,02 m NaCl enthaltend) auf 0,02 m Phosphatpuffer pH 6,3 (0,5 m NaCl enthalten) ansteigend.

Proteingehalt in mg/ml (⊙——⊙), Inhibitorgehalt in △E·10 (•——•), Leitfähigkeit des Eluats, 1/R (⊙——⊙).

C. DISKUSSION

a) Zur Methodik:

Für den Nachweis der Inhibitorkapazität gegenüber Kallikreinen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Man könnte die Minderung der Blutdrucksenkung ermitteln, die durch eine definierte Kallikreinmenge hervorgerufen wird; dabei würden aber Kinine stören, welche aus evtl. begleitendem Kininogen durch das Testkallikrein freigesetzt werden. Ein enzymatischer Nachweis ist vorzuziehen; er beruht auf der Hydrolyse N-substituierter Aminosäureester durch Kallikrein. Wir haben die dafür schon früher entwickelten Methoden (35, 56) unseren Bedürfnissen angepaßt. Besonders wichtig ist die Verwendung von Serumkallikreinpräparaten, deren esterolytisches Vermögen nicht in nennenswerter Weise auf Begleitenzymen beruht. Organkallikreine unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Substraten ganz erheblich von dem Enzym aus Serum; sie spalten z. B. kaum Amide und Proteine, wozu Serumkallikrein sehr gut imstande ist. Organkallikreine werden im Gegensatz zu Serumkallikrein nicht durch Sojabohnen-Inhibitor gehemmt (26, 65), auch ihre Empfindlichkeit gegen Serum-Inhibitor ist geringer als die von Serumkallikrein (26). HABERMANN und KLETT (26) haben ein hochgereinigtes Enzym aus Schweineserum hergestellt, dessen Verwendung unsere Versuche ermöglichte.

b) Zur Gelfiltration:

Unsere Versuche zur Gelfiltration und Elektrophorese von Humanplasma schließen an Experimente von HABERMANN, KLETT und MÜLLER (27) an, bei denen der Verbleib einzelner Komponenten des Kininsystems verfolgt wurde. Bei Gelfiltration war Kininogen unmittelbar vor Albumin aus der Säule ausgetreten, gleichzeitig auch ein Teil des Kallikrein-Inhibitors. Kininase war zwischen γ-Globulinen und Makroglobulinen erschienen, ein

zweiter Anteil der Inhibitoraktivität mit den Makroglobulinen.

Wir versuchten zunächst eine Differenzierung zwischen der Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin und Serumkallikrein durch Gelfiltration zu erreichen. In Bestätigung der erwähnten Befunde fanden wir die Hauptmenge der Kallikrein-Inaktivierung im vorderen Teil der Albuminzone. Das Maximum der Ausschaltung von Trypsin und Chymotrypsin lag in der gleichen Region. Relativ geringe Aktivitäten waren in höhermolekularen Bereichen (zwischen γ-Globulin und Makroglobulin) nachweisbar; ein strenger Parallelismus zwischen den Inhibitoren von Trypsin, Chymotrypsin und Serumkallikrein fand sich in diesen Regionen nicht. In Anbetracht der erwähnten relativ geringen Aktivität der höhermolekularen Fraktionen möchten wir offen lassen, ob es sich hier tatsächlich um spezielle Proteine handelt oder um Aggregatzustände des in der Hauptfraktion monomer vorliegender Inhibitors.

Man könnte aus dem Erscheinen des Inhibitormaximums kurz vor den Albuminen schließen, daß das Molekulargewicht der zugrundeliegenden Proteine etwas größer als beim Albumin sei. Dem stehen jedoch Bedenken im Wege. Wie HABERMANN beobachtete und ANDREWS (1) mittlerweile publizierte, erscheinen Glykoproteide bei Gelfiltration größer als ihrem tatsächlichen, in der Ultrazentrifuge bestimmten Molekulargewicht entspricht. Das gilt auch für das saure Glykoproteid Kininogen, das in der Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht von 48 000 (21), nach dem pharmakologischen Test ein solches von 53 000 (21) aufweist, bei Gelfiltration jedoch größer als 65 000 (23) erscheint. Man könnte dieses Phänomen auf die stärkere Raumfüllung von zuckerreichen Proteinen beziehen; sie beruht auf der starken Hydratisierung der in der Proteinoberfläche liegenden Kohlenhydrat-Bausteine. Auch die bisher beschriebenen Proteasenhemmstoffe aus Blutplasma sind Glykoproteine; das Molekulargewicht derartiger Wirkstoffe sollte also nicht aus ihrem Verhalten bei Gelfiltration erschlossen werden.

c) Zur Elektrophorese:

Schon früher waren Kininogen, Kininase und Kallikreinhemmung in der α -Globulinfraktion gefunden worden; die Maxima der drei Wirkqualitäten deckten sich jedoch nicht (HABERMANN, unveröffentlicht).

Wir lokalisierten den Gipfel der Kallikreinhemmung im Bereich der α_2-Globuline, während für Trypsin zwei Gipfel festgelegt werden konnten, von denen der eine vor dem Kallikreininhibitor in den α_1-Globulinen, der andere hinter ihm in den β_1-Globulinen lag. Es war also zu vermuten, daß zumindest ein Teil der plasmaeigenen Inhibitoren spezifisch für Kallikrein ist. Bisher sind mehrere Proteinase-Inhibitoren in Humanplasma beschrieben worden, sowohl in der α_1-(6, 36, 52, 59) als auch in der α_2-Globulinfraktion (15, 31, 36, 37, 51, 60) und schließlich ein Inter-α-Inhibitor (32, 33).

d) Zur Reinigung des Inhibitors:

Um die Zusammenhänge zwischen der Hemmung von Serumkallikrein und anderen Proteinasen besser zu verstehen, machten wir uns an die Reinigung des dafür verantwortlichen Prinzips. Die bisher bekannten Trypsin-Inhibitoren waren zumeist durch Fällung mit Ammoniumsulfat bei verschiedenen pH-Werten vorfraktioniert und dann einem oder mehreren elektrophoretischen bzw. chromatographischen Verfahren unterworfen worden. Wir mußten bei der Auswahl der Methoden darauf achten, daß der pH-Wert nicht zu weit gesenkt wurde, weil die Stabilität der meisten bisher beschriebenen Hemmstoffe unter pH 5 stark absinkt (59).

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir Rinderserum, weil es sich im Vorversuch als besonders reich an Inhibitor erwiesen hatte und in beliebigen Mengen zur Verfügung stand. Wir nahmen dabei in Kauf, daß die Informationen aus den Vorversuchen - bei denen Humanserum eingesetzt worden war - zunächst nicht ausgenutzt werden konnten. Da wir die Hemmwirkung speziell gegen Serumkallikrein verfolgen wollten, verbot sich ein blindes Nacharbeiten der Reinigungsvorschriften für den Trypsin-Inhibitor,

zumal die meisten Verfahren mit einer weitgehenden Erniedrigung des pH-Wertes belastet sind. Nach einer Reihe von Vorversuchen erwies es sich als günstig, zwei Ammoniumsulfatfällungen bei neutralem bzw. schwach saurem pH hintereinander zu schalten und die aktive Fraktion der Chromatographie an DEAE-SEPHADEX zu unterwerfen. Der Inhibitor wird erst bei relativ hoher Ionenstärke aus dem basischen Ionenaustauscher-Gel eluiert, was auf einen sehr niedrigen isoelektrischen Punkt schließen läßt; in dieser Hinsicht würde er zu den anderen bisher beschriebenen Proteasen-Inhibitoren passen.

HABERMANN (unveröffentlicht) hat später gefunden, daß bei der Ionenaustausch-Chromatographie die Trypsinhemmung in zwei Gipfeln erscheint, von denen der eine mit Chrymotrypsin-Hemmung, der zweite mit Kallikreinhemmung verknüpft ist. Es liegen also auch in Rinderserum mindestens zwei Trypsin-Inhibitoren vor, während bisher nur die Existenz eines einzigen Serumkallikrein-Inhibitors erwiesen ist.

In der Zeit, die seit Abschluß der praktischen Arbeiten inzwischen verstrich, gelang es HABERMANN (23) den Serumkallikrein-Inhibitor durch zusätzliche Chromatographie an Ca-Hydroxylapatit rein zu erhalten. Er war elektrophoretisch (in Cellogel und Stärkegel) sowie bei Gelfiltration an SEPHADEX G 100 homogen und hemmte nicht nur Serumkallikrein sondern auch Trypsin und Plasmin. Chymotrypsin und Pankreaskallikrein dagegen waren gegen den Inhibitor resistent.

Beim Vergleich des zeitlichen Ablaufes der Hemmung von Serumkallikrein und Trypsin war aufgefallen, daß die Trypsin-Inhibition viel schneller ihren Endwert erreicht hatte als die von Serumkallikrein. Das erinnerte an eine Beobachtung, die WU und LASKOWSKI bezüglich Plasminhemmung durch den von ihnen beschriebenen Trypsin-Inhibitor aus Rinderserum gemacht hatten. Daraufhin verglich Habermann seinen Inhibitor mit einem von Laskowski übersandten Vergleichspräparat. Die beiden Wirkstoffe stimmten bezüglich zeitlichem Ablauf der Hemmung, relativer Hemmung verschiedener Enzyme und auch immunelektrophoretisch überein.

Damit hatte sich auf dem Gebiet der Serum-Inhibitoren wiederholt, was bei der Erforschung der Pankreas-Inhibitoren bereits eingetreten war: Auch für Trasylol hatte man zunächst angenommen, daß es ein spezifischer Kallikrein-Inhibitor sei; erst später wurde man auf seine Identität mit dem Trypsin-Inhibitor von KUNITZ und NORTHROP aufmerksam.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren angegeben, mit dessen Hilfe der Gehalt von Plasma und seinen Fraktionen an Kallikrein-Inhibitor bestimmt werden kann. Das esterolytische Vermögen dient dabei als Indikator der Kallikreinwirkung. Serumkallikrein wird stärker gehemmt als Pankreaskallikrein; Rinderserum und Schweineserum hemmen etwas stärker als Humanplasma.

Bei Gelfiltration an SEPHADEX G 200 verteilen sich die Inhibitoren für Trypsin, Chymotrypsin und Serumkallikrein in analoger Weise: Der Hauptgipfel erscheint mit den Albuminen; geringe Aktivitäten finden sich im Bereich der γ- und Makroglobuline wieder. Die makroglobulären Inhibitorbereiche für die drei Enzyme sind nicht deckungsgleich.

Trennt man Humanplasma elektrophoretisch in Polyvinylchlorid-Pulver, so verteilt sich die Trypsinhemmung auf zwei deutlich getrennte Bereiche in der α_1- bzw. β_1-Region: Serumkallikrein wird in dem dazwischen liegenden α_2-Bereich maximal gehemmt.

Der Inhibitor für Serumkallikrein wird durch fraktionierte Ammonsulfatfällung bei wechselndem pH und anschließende Chromatographie an DEAE-SEPHADEX gereinigt. Es handelt sich um ein stark saures Protein.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. E. Habermann für die Überlassung des Themas, sowie für die ständige und unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung und die wertvollen Hinweise bei der Abfassung dieser Arbeit sehr bedanken.

Herrn Professor Dr. D. Henschler bin ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und für die Möglichkeit zur Arbeit in dem von ihm kommisarisch geleiteten Institut zu großem Dank verpflichtet.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1) ANDREWS, P. — Biochem. J. 96, 595 (1965).

2) ANDERER, F.A. — Z. Naturforsch. 20 b, 499 (1965).

3) ANDERER, F.A. und S. HÖRNLE — Z. Naturforsch. 20 b, 457 (1965).

4) BACK, N., and R. STEGER — Life Sci. 4, 153 (1965).

5) BLENNEMANN, G. — Inaug. Diss., Würzburg 1965.

6) BUNDY, H.F., and J.W. MEHL — J. Biol. Chem. 234, 1124 (1959).

7) CHAUVET, J., G. NOUVEL et R. ACHER — Biochem. biophys. Acta 92, 200 (1964).

8) DUTHIE, E.S., and L. LORENZ — Biochem. J. 44, 167 (1949).

9) EISEN, V. — J. Physiol. 166, 514 (1963).

10) FREY, E.K., H. KRAUT und E. WERLE — "Kallikrein (Padutin)", Enke-Verlg., Stuttgart 1950.

11) FRITZ, H., G. HARTWICH und E. WERLE — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 150 (1966).

12) FRITZ, H., F. WOITNIAS und E. WERLE — Hoppe-Seyler's Z . physiol. Chem. 345, 168 (1966).

13) FRITZ, H., I. TRAUTSCHOLD und E. WERLE — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965).

14) GANROT, P.O. — Clin. Chim. Acta 13, 518 (1966).

15) GANROT, P.O. — Clin. Chem. Acta 13, 597 (1966).

16) GRAY, J.L., S.G. PRIEST, W.F. BLATT, U. WESTPHAL, and H. JENSEN — J. Biol. Chem. 235, 56 (1960).

17) GREEN, N.M., and E. WORK — Biochem. J. 54, 257 (1953).

18) GREEN, N.M., and E. WORK — Biochem. J. 54, 347 (1953).

19) HABERMANN, E. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 15 (1962).

20) HABERMANN, E. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 230 (1963).

21) HABERMANN, E. — Biochem. Z. 337, 440 (1963).

22) HABERMANN, E. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 474 (1966).

23) HABERMANN, E. — Ann. N.Y. Acad. Sci., in Druck

24) HABERMANN, E., und G. BLENNEMANN — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 357 (1964).

25) HABERMANN, E., G. BLENNEMANN und B. MÜLLER — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 444 (1966).

26) HABERMANN, E., und W. KLETT — Biochem. Z. 346, 133 (1966).

27) HABERMANN, E., W. KLETT und B. MÜLLER — unveröffentlicht.

28) HABERMANN, E., W. KLETT und G. ROSENBUSCH — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 464 (1963).

29) HABERMANN, E. und B. MÜLLER — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 464 (1966).

30) HAENDLE, H., H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD und E. WERLE — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 343, 185 (1965/66).

31) HAVERBACK, B.J., B. DYCE, H.F. BUNDY, S. K. WIRTSCHAFTER, and H.H. EDMONDSON — J. Clin. Invest. 41, 972 (1962).

32) HEIDE, K., N. HEIMBURGER und H. HAUPT — Clin. Chim. Acta 11, (1) 82 (1965).

33) HEIMBURGER, N., und G. SCHWICK — in "Protides of biological fluids" Edt: H. PEETERS, Elsevier, Amsterdam 1962, p. 303 (9th Colloq. Brügge 1961).

34) HENRIQUES, O. B., A.A.C. LAVRAS, M. FICHMAN, and Z.P. PICARELLI — Biochem. Pharmacol. 15, 31 (1966).

35) HESTRIN, S. — J. Biol. Chem. 180, 249 (1949).

36) JACOBSSON, K. — Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7, Suppl. 14, 55 (1955).

37) JAMES, K., F.B. TAYLOR, Jr., and H.H. FUDENBERG — Clin. Chim. Acta 13, 359 (1966).

38) KASSELL, B., M. RADICEWIC, S. BERLOW, R. J. PEANASKY, and M. LASKOWSKI, Sr. — J. Biol. Chem. 238, 3274 (1963).

39) KASSELL, B., M. RADICEWIC, M. J. ANSFIELD, and M. LASKOWSKI, Sr. — Biochem. Biophys. Res. Comm. 18 (2), 255 (1965).

40) KRAUT, H., W. KÖRBEL, W. SCHOLTAN und F. SCHULTZ — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 321, 90 (1960).

41) KRAUT, H. und N. BHARGAVA — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 334, 236 (1963).

42) KRAUT, H. und N. BHARGAVA — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 338, 231 (1964).

43) KRAUT, H., N. BHARGAVA, F. SCHULTZ und H. ZIMMERMANN — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 334, 230 (1963).

44) KUNITZ, M., and J.H. NORTHROP — J. gen. Physiol. 19, 991 (1936).

45) LEWIS, G.P. — J. Physiol. 140, 285 (1958).

46) LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL — J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

47) MANSFELD, V., M. RYBÁK, Z. HORÁKOVA und I. HLADOVEC — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 318, 6 (1960).

48) MARGOLIS, J. — Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 130 (1963).

49) MARTIN, Ch. — J. Biol. Chem. 236, 2672 (1961).

50) MARTIN, Ch. — J. Biol. Chem. 237, 2099 (1962).

51) MEHL, J.W., W.O'CONNELL, and J. DE GROOT — Science 145, 821 (1964).

52) MOLL, F.C., S.F. SUNDEN, and J.R. BROWN — J. Biol. Chem. 233, 121 (1958).

53) MORIYA, H., J.V. PIERCE, and M.E. WEBSTER — Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 172 (1963).

54) PARK, M.Y. — Dissertation Abstr. 25 (6), 3252 (1964) (Univ. Microfilms, Ann Arbor, Mich., Order No. 64 - 12 495, 93 pp.)

55) PEANASKY, R.J., and M. LASKOWSKI — J. Biol. Chem. 204, 153 (1953).

56) ROBERTS, P.S. — J. Biol. Chem. 232, 285 (1958).

57) SCHMITZ, A. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 255, 234 (1938).

58) SCHULTZE, H.E., I. GÖLLNER, K. HEIDE, M. SCHÖNEBERGER und G. SCHWICK — Z. Naturforsch. 10 b, 463 (1955).

59) SCHULTZE, H.E., K. HEIDE und H. HAUPT — Klin. Wschr. 40, 427 (1962).

60) SCHULTZE, H.E., N. HEIMBURGER, K. HEIDE, H. HAUPT, K. STÖRIKO und G. SCHWICK — Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon, 1963
Karger, Basel 1963, p. 1315.

61) SHULMANN, N.R. — J. Biol. Chem. 213, 655 (1955).

62) TRAUTSCHOLD, I., E. WERLE, H. HAENDLE und H. SEBENING — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 328 (1963).

63) VOGT, W. — J. Physiol. 170, 153 (1964).

64) WEBSTER, M.E., and J.V. PIERCE — J. Pharmacol. & Exp. Therap. 130, 484 (1960).

65) WERLE, E., M.M. FORELL und L. MAIER — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 225, 369 (1955).

66) WERLE, E., R. KEHL und K. KOEBKE — Biochem. Z. 320, 372 (1950).

67) WERLE, E. und I. TRAUTSCHOLD — Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 117 (1963).

68) WU, F.C., and M. LASKOWSKI — J. Biol. Chem 235, 1680 (1960).

LEBENSLAUF

Am 27. August 1937 wurde ich als Sohn des Offiziers Hans Manke und seiner Ehefrau Ruth, geb. Seydler, in Königsberg/Opr. geboren. Von 1943 bis 1948 besuchte ich die Grundschulen in Bartenstein/Opr. und Friedenfels/Opf., anschließend für neun Jahre die Oberrealschulen für Jungen in Weiden/Opf. und in Würzburg, wo ich 1957 die Reifeprüfung bestand.

Mit dem Medizinstudium begann ich im Herbst 1957 an der Universität Würzburg, 1958 legte ich dort das Vorphysikum, 1960 das Physikum ab. Nach den klinischen Semestern an den Universitäten München, Wien und Montpellier beendete ich mein Studium Ende Dezember 1963 in Würzburg mit dem Staatsexamen.

In dreizehn darauffolgenden Monaten war ich als Medizinalassistent am Krankenhaus in Kleve, an der Medizinischen Poliklinik und dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg tätig. Von Mai 1965 bis Januar 1966 arbeitete ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg an der vorliegenden Arbeit.

Seit Beendigung meiner Medizinalassistentenzeit am Krankenhaus Bethel in Bückeburg Ende November 1966 bin ich am Institut Pasteur in Paris tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt und von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Hans-Georg Manke

BÖHLER-DRUCK

87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10
Tel. 54143